

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-347162

(43) 公開日 平成4年(1992)12月2日

(51) Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

序内整理番号

F 1

技術表示箇所

A 61 L 25/00

A 7038-4C

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 4 頁)

(21) 出願番号

特願平3-118558

(22) 出願日

平成3年(1991)5月23日

(71) 出願人

000004178

日本合成ゴム株式会社

東京都中央区築地2丁目11番24号

(72) 発明者

玉田 晴

東京都中央区築地2丁目11番24号 日本合成ゴム株式会社内

(72) 発明者

安田 健司

東京都中央区築地2丁目11番24号 日本合成ゴム株式会社内

(74) 代理人

弁理士 有賀 三幸 (外2名)

(54) 【発明の名称】 生体組織接着剤

(57) 【要約】

【構成】 (a) 1分子中にグルタミンとリジンを各々少なくとも1残基以上有するオリゴペプチド並びに (b) コラーゲン及び/又はゼラチンを含有する、若しくは前記 (a) 並びに前記 (b) を化学的に結合した化合物を含有する生体組織接着剤。

【効果】 これを用いれば従来の縫合法では縫合不可能であった創傷部位や病変部位を接着・固定することができ、また縫合時間も大幅に短縮することができる。また、従来のフィブリン糊にくらべ、接着速度や接着強度が向上し、また、取扱い性も簡便であり、更に、血液製剤を使用する必要がないためウイルスなどによる感染の心配のない安全な生体組織接着剤である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 1分子中にグルタミンとリジンを各々少なくとも1残基以上有するオリゴペプチド、並びに (b) コラーゲン及び/又はゼラチンを含有する生体組織接着剤。

【請求項2】 (a) 1分子中にグルタミンとリジンを各々少なくとも1残基以上有するオリゴペプチドと (b) コラーゲン及び/又はゼラチンとが化学的に結合した化合物を含有する生体組織接着剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は外科手術時の創面や切傷、擦過傷等の創面、あるいは火傷による創面の接着、創傷被覆、固定、止血、あるいは損傷などにより損失した組織の補填や創傷治癒促進などに用いることができる生体組織接着剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 外科手術時の創面の接着などには、古くから、絹糸、ナイロン糸、ポリプロピレン糸などによる縫合が行われている。また、創傷治癒後の抜糸処理が不要な生体分解性高分子であるポリグリコール酸などから作られた縫合糸も最近用いられるようになってきた。しかし、縫合糸による接着は、基本的に二次的な組織損傷を避けられず、また、縫合手技に多くの時間がかかり患者に多大な負担をかけるばかりでなく、微小部位の接着に関しては、不可能であったり高度の外科手術技量が必要され、その使用に制限がある場合がある。

【0003】 そこで、これらの縫合による接着の問題点を解決するため、種々の生体組織接着剤が提案されている。たとえば、シアノアクリレート系の瞬間接着剤の応用が試みられている。しかし、この接着剤は生体に対し毒性があり、分解速度が遅いため組織の治癒過程を妨害し、また、その硬化物の力学的性質が生体組織のそれと十分に適合しているとはいえず、広く使用できるものではない。

【0004】 一方、生体組織接着剤として、血液凝固反応を利用したフィブリン網が、古くから知られている。フィブリン網はフィブリノーゲンを主成分とし、これにトロンビン及び血液凝固因子III因子等を加え、フィブリンを形成せしめ、組織を接着しようとするものである。しかしながら、フィブリン網は組織接着には十分な強度を有するとは言えず、その接着も持続性がなく、更に取扱いが不便である等の欠点を有している。

【0005】 このフィブリン網の欠点を改善するため、網フィブリンを混合し接着強度を上げる方法（特開昭64-85272号）、持続性や創傷治癒性を向上させるために、フィブロンectinを混合する方法（特開平1-99565号）などが知られている。しかし、これらの接着剤には血液凝固剤であるフィブリノーゲンが不可欠であり、そのため、エイズ、肝炎などのウイルスの侵入の危険性があ

り、安全に使用できるとはいえないものであった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の目的は、接着速度や接着強度に優れ、創傷治癒性や取扱い性にも優れた安全な生体組織接着剤を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 すなわち本発明は、

(a) 1分子中にグルタミンとリジンを各々少なくとも1残基以上含有するオリゴペプチド、並びに (b) コラーゲン及び/又はゼラチンを含有する生体組織接着剤を提供するものである。更に本発明は、(a) 1分子中にグルタミンとリジンを各々少なくとも1残基以上有するオリゴペプチドと (b) コラーゲン及び/又はゼラチンとが化学的に結合した化合物を含有する生体組織接着剤を提供するものである。

【0008】 本発明で用いる (a) 成分であるオリゴペプチドは、その分子中にグルタミンとリジンをそれぞれ1残基以上有していれば、そのアミノ酸配列はいかなる配列でもよい。しかし、アミノ酸残基の数としては、2～100が好ましく、特に5～50が好ましい。これが2未満であると接着強度が不十分であり、100を超えると合成するのに多大な工程を必要とし、収率も低くなる。

【0009】 好ましいオリゴペプチドとしては、例えば次のものが挙げられる。

(1)  $\text{NH}_2\text{-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gly-Ala-Gly-Asp-Val-COOH}$

(2)  $\text{NH}_2\text{-Ala-Gly-Ala-Gly-Gly-His-His-Leu-Ala-Ala-Ala-Lys-Gly-Ala-Ala-Asp-Val-COOH}$

ここで (1) はフィブリノーゲン鎖のC末端のシーケンスであり、(2) はその改変ペプチドである。

【0010】 オリゴペプチドの製法としては、如何なる合成法を用いてもよいが、より簡便には、ペプチド固相合成法が最適である。一例を挙げると、各種Fmoc化アミノ酸を用いて、ペプチドシンセサイザーを使用して、固相担体上にオリゴペプチドを合成する方法が挙げられる。合成後、固相担体からオリゴペプチドを切り出し、脱保護した後、逆相液体クロマトグラフィーにより精製することができ、合成したオリゴペプチドは、アミノ酸分析、一次構造解析などの方法で確認することができる。

【0011】 (b) 成分のコラーゲンやゼラチンはそれぞれ単独で使用してもよいが、それぞれを任意の割合で混合したコラーゲン-ゼラチン混合物として用いることもできる。これらのコラーゲンやゼラチンは豚皮などから抽出することができるが、より簡便には市販のコラーゲンやゼラチンを用いればよい。市販のコラーゲンやゼラチンとしては、例えばSIGMA社製牛臓抽出コラーゲンやゼラチン、あるいは新田ゼラチン社製コラーゲンが挙

3  
げられる。また、コラーゲンには、その組織分布により10種類近いタイプが報告されているが、それを接着する部位により使い分けることが好ましい。例えば軟組織の接着にはコラーゲンI型を、基底膜の接着にはコラーゲンIV型という様に用いれば好ましいが、経済性や簡便性を考えれば通常はコラーゲンI型を用いれば良い。

【0012】(a)成分と(b)成分の好ましい配合比は、(b)成分1gに対して、(a)成分が0.05~5ミリモルであり、より好ましくは0.1~3ミリモルである。(a)成分が0.05ミリモル未満であると接着速度が十分でなく、5ミリモルを超えると不経済であるばかりでなく、接着後の力学的特性に悪影響を及ぼすことがある。

【0013】本発明に用いる(a)成分と(b)成分は、粉末のまま使用しても接着効果はあるが、水溶液又は緩衝液として用いることがより好ましい。このときの(a)成分及び(b)成分合計の濃度は、0.01~50重量%とすることが好ましく、0.05~30重量%とすることが特に好ましい。この濃度が0.01重量%未満では、十分な接着速度と接着強度が得られず、50重量%を超えると粘度が高くなり取扱いに不便を生じることがある。なお、(b)成分としてコラーゲンを用いる場合は、コラーゲンを十分溶解するために(a)成分及び(b)成分の合計の濃度を0.01~0.5重量%とすることが好ましい。

【0014】本発明の生体組織接着剤を使用するには、(a)成分と(b)成分を予め又は使用直前に体外で混合し、創傷部位などに適用すればよい。また、必要に応じて創傷部位などに(a)成分及び(b)成分を別々に適用し、その部位で両成分を混合させる方法も用いることもできる。更に(a)成分と(b)成分をあらかじめ化学的に結合させて使用に供することもできる。この一例としては、脱保護する前のオリゴペプチドと(b)成分とを、一般的なペプチド合成に用いられる縮合反応を用いてカップリングし、次いでフッ化水素、トリフルオロ酢酸等によりアミノ酸側鎖保護基をペプチドから脱離させる脱保護により結合させる方法が挙げられる。

【0015】本発明の生体組織接着剤は、必要によりあらかじめ体外でトランスグルタミナーゼ酵素で、プレポリマー状態として使用しても良い。更に、使用時に本発明の生体組織接着剤に、トランスグルタミナーゼなどの血液凝固因子やフィブロンectin、ラミニンなどの細胞接着性タンパク質、インターフェロンなどの生理活性物質などを添加して用いることもできる。

【0016】  
【発明の作用及び効果】本発明の生体組織接着剤を生体組織に使用すると、生体組織に存在する血液凝固因子(トランスグルタミナーゼ)が、(a)成分のオリゴペプチドを介して、(b)成分、生体組織に存在するフィブリノーゲンやフィブロンectin、生体組織のコラ

4  
ーゲンなどと架橋反応を行い、架橋物を生成する。この架橋物は、優れた止血、接着、固定効果などを有し、創傷治癒を促進する。更に治癒と共にその架橋物は、生体のタンパク質分解酵素などにより、分解吸収されて創傷治癒が完成する。本発明の生体組織接着剤は、このような作用を有するので、これを用いれば従来の縫合法では縫合不可能であった創傷部位や病変部位を接着・固定することができ、また縫合時間も大幅に短縮することができる。また、従来のフィブリン糊にくらべ、接着速度や接着強度が向上し、また、創傷治癒性や取扱い性にも優れた生体組織接着剤であり、更に、血液製剤を使用する必要がないためウイルスなどによる感染の心配のない安全な生体組織接着剤である。

【0017】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

合成例1

Milligen社製9050用Pmoc化側鎖保護アミノ酸活性エステル(アミノ酸のアミノ基をPmocで保護したカルボキシル基をベンタフルオロエステルなどで活性化した試薬)を用い、バリンを結合したポリアミド/キーゼルゲル複合体樹脂(商品名:Val結合IA樹脂)上に、Milligen社製ペプチドシンセサイザー9050を使用して、以下のオリゴペプチド(以下「ペプチドA」という)を合成した。

$\text{NH}_2\text{-Gly-Gln-Gly-Gln-Gln-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-COOH}$

合成後、樹脂を取り出し、トリフルオロ酢酸を用いて、ペプチドAの樹脂からの切り出しと、脱保護を行った。得られたペプチドAをウォーターズ社製マイクロボンドスフェアC18カラムを用いて、逆相液体クロマトグラフィーにより精製した。精製したペプチドAを凍結乾燥して、重量を測定したところ、仕込みアミノ酸に対する収率は70%であった。このペプチドAの架橋活性を確認するため、このペプチドAの緩衝液にトランスグルタミナーゼ(SIGMA社製)を加え、GPCにより架橋挙動を検討した結果、ペプチドAの二量体と三量体の形成が見られ、トランスグルタミナーゼによる架橋活性を有していることがわかった。

【0018】合成例2

合成例1と同様に、下記のオリゴペプチド(以下「ペプチドB」という)を合成した。

$\text{NH}_2\text{-Ala-Gln-Ala-Gln-Gln-His-His-Leu-Ala-Ala-Ala-Lys-Gln-Ala-Ala-Asp-Val-COOH}$

収率は68%であった。このペプチドBも合成例1のペプチドAと同様に架橋活性を有しており、その活性はより強いことがわかった。

【0019】合成例3

SIGMA社製ゼラチンの0.5重量%の緩衝液100mlに合成例1で合成したペプチドAを50mg混合し、その溶

液に0℃で攪拌しながら100mgのWSC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジミド塩酸塩)を加えて、2時間反応させた。反応後、アセトン中で沈澱させ、乾燥して、ペプチド結合ゼラチン(以下「ペプチドC」という)を合成した。ペプチドCも架橋反応活性を有しているのを確認した。

#### 【0020】実施例1

新田ゼラチン社製コラーゲン水溶液(3mg/ml)、SIGMA社製ゼラチンの20重量%緩衝溶液の1種又は2種、並びに合成例1及び2で製造したペプチドA及びBを表1に示す量比で混合し、本発明の生体組織接着剤及び比較の接着剤(試料番号1~12)を調製した。次いで、これらの接着剤及び市販のフィブリン糊について、下記\*

\*に示す方法で止血効果及び接着(剥離)強度の試験を行った。結果を表1に示す。

【0021】試験方法：家兎(日本白色種、オス、3kg)をネンプタールにより麻酔したのち、背部を剃毛し、背部皮膚を正中線に垂直にメスで3cm切開した。その創面に表1に示す試料を0.1~0.5ml塗布し、数分間創面を圧着した。圧着後の切開部からの出血の有無を肉眼で観察し、更に、あらかじめその切開線の両側に装着した1-O鋼糸をテンシロンで引っ張り、切開創の接着(剥離)強度を求めた。

【0022】

【表1】

試料番号	(a) 成分		(b) 成分		止血効果*	剥離強度 (kg)
	ペプチドA	ペプチドB	コラーゲン水溶液	ゼラチン緩衝溶液		
	mg (ミリモル)	mg (ミリモル)	(ml)	(ml)		
本発明	1	50(0.02)	—	5	○	1.15
	2	—	—	5	○	1.17
	3	25(0.015)	50(0.025)	—	○	0.82
	4	—	—	5	○	0.88
	5	100(0.24)	25(0.014)	—	○	1.35
	6	—	—	—	○	1.42
	7	50(0.02)	100(0.22)	—	○	1.42
	8	—	—	—	○	1.42
	9	100(0.05)	50(0.025)	—	○	1.58
	10	50(0.02)	50(0.025)	—	○	1.51
比較	11	—	—	5	△	0.15
	12	—	—	—	△	0.13
	フィブリン糊	—	—	2	○	0.25

\*1: 止血効果

○: 十分に止血されていた。

△: 止血が不十分であった。

×: 止血効果が認められなかった。

#### 【0023】実施例2

ペプチドCの20重量%緩衝溶液を実施例1と同様に兎を用いて、その止血効果と接着(剥離)強度の試験を行

った。この結果、接着剤成分で止血効果がみられ、接着試験でも1.32kgの剥離強度を示した。